

Rec'd PCT/PTG 27 SEP 2004

ATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
NATIONAL BOARD OF PATENTS AND REGISTRATION

PCT / F I O 3 / 0 0 2 3 6

Helsinki 20.5.2003

ETUOIKEUSTODISTUS
PRIORITY DOCUMENT

REC'D 10 JUN 2003

WIPO

PCT

Hakija
Applicant

Valio Oy
Helsinki

Patenttihakemus nro
Patent application no

20020593

Tekemispäivä
Filing date

27.03.2002

Kansainvälinen luokka
International class

C12P

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Menetelmä konjugoidun linolihapon valmistamiseksi"

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat alkuperäisiä jäljennöksiä
Patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annettujen asiakirjojen mukaisesti,
patenttivaatimuksista ja tiivistelmästä.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the
description, claims and abstract originally filed with the Finnish Patent
Office.

Marketta Tehikoski

Marketta Tehikoski
Apulaistarkastaja

Maksu. 50 €
Fee 50 EUR

Maksu perustuu kauppa- ja teollisuusministeriön antamaan asetukseen 1027/2001 Patentti- ja rekisterihallituksen maksullisista suoritteista muutoksineen.

The fee is based on the Decree with amendments of the Ministry of Trade and Industry No. 1027/2001 concerning the chargeable services of the National Board of Patents and Registration of Finland.

Osoite: Arkadiankatu 6 A
P.O.Box 1160
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

Puhelin: 09 6939 500
Telephone: + 358 9 6939 500

Telefax: 09 6939 5328
Telefax: + 358 9 6939 5328

BEST AVAILABLE COPY

Menetelmä konjugoidun linolihapon valmistamiseksi

Tekniikan ala

Keksintö koskee menetelmää konjugoidun linolihapon valmistamiseksi. Erityisesti kuvataan menetelmää konjugoidun linolihapon ja varsinkin sen cis-9,trans-11 -isomeerin valmistamiseksi viljasta hyötybakteerien avulla.

Keksinnön tausta

CLA on yleisnimi konjugoituneen linolihapon eri isomeereille, joista ainoastaan kahden isomeerin (cis-9,trans-11 -isomeeri eli boviinihappo ja trans-10,cis-12 -isomeeri) on todettu olevan biologisesti aktiivisia. Synteettisesti valmistettuja CLA-valmisteita on kaupallisesti saatavilla, mutta nämä sisältävät yleensä kaikkia CLA:n eri isomeerejä ja vain 40 % c9,t11 -isomeeriä. Myös eläinperäisiä tuotteita, kuten lihaa ja maitoa, voidaan käyttää CLA:n lähteenä. Näiden yhtenä etuna on se, että niiden sisältämästä CLA:sta suuri osa on c9, t11-isomeeriä, esimerkiksi maidon CLA sisältää 80 % c9, t11-18:2 -isomeeriä.

Useissa tutkimuksissa on osoitettu, että eläinrasvat sisältävät rasvahappoa, joka mm. estää koe-eläimissä syöpää, vaikuttaa kasvutekijöihin ja saattaa säädellä rasvakudoksen määrää elimistössä. Michael Pariza havaitsi tutkiessaan hampurilaispihvejä niiden sisältävän rasvahappoa, joka analysoitiin konjugoituneeksi linolihapoksi (CLA). Koe-eläimillä suoritetuissa tutkimuksissa havaittiin CLA:ta sisältänyttä ravintoa syöneiden ryhmässä rintarauhas-, maha- ja paksusuolisyyöpätapausten alentuneen vertailuryhmään verrattuna (Pariza, M.W., Loretz, L.J., Storkson, J.M. and Holland, N.C. 1983. Mutagens and modulator of mutagenesis in fried ground beef. Cancer Res. (Suppl.) 43: 2444s-2446s, ja Pariza, M.W, and Hargraves, W.A. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenzanthracene. Carcinogenesis 6:591-593). Myös ihmissolujen kudosisäilytyksessä on CLA:lla pystytty estämään syöpäsolujen kehittyminen. Vaikutusmekanismi on edelleen tuntematon, mutta CLA:n on havaittu vaikuttavan syövän eri kehitysvaiheisiin, moniin kasvutekijöihin ja mahdollisesti myös syöpää aiheuttavien aineiden aineenvaihduntaan maksassa. On myös ehdotettu, että CLA toimisi antioksidanttina (Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J.A., and Pariza, M.W. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. Cancer Res. 51:6118-6124), jolloin yhdiste suojaais solukalvoja vapaiden radikaalien haitallisilta vaikutuksilta. Lisäksi yhdisteen

kolesterolitasoa laskevaa vaikutusta on selvitetty ja todettu, ettei yhdiste laske hyvän HDL:n määrää, niinkuin kolesterolia laskevat lääkkeet tekevät (Lee, K.N., Kritchevsky, D, and Pariza, M.W. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108: 19-25). CLA saattaa auttaa myös
 5 laihduttajia, sillä yhdisteen on havaittu pilkkovan rasvakudosta (Park et al. 1999. Changes in Body Composition in Mice During Feeding and Withdrawal of Conjugated Linoleic Acid. *Lipids* 34, 243 - 248).

Konjugoitumattomalla linolihapolla on puolestaan todettu olevan haitallisia vaikutuksia, kuten esimerkiksi rintasyöpää stimuloiva vaikutus. Myös
 10 konjugoimattoman linolihapon antimikrobinen vaikutus on yleisesti tunnettua.

CLA:ta voidaan valmistaa kemiallisesti tai entsyymaattisesti isomeroimalla linolihappoa. Luonnollista CLA:ta muodostuu mm. märehtijöiden pötsissä *Butyrivibrio fibrisolvens* -bakteerin toiminnan seurauksena monityydytty-mättömistä rasvahapoista ja erittyy sieltä sekä maitoon että lihaan, joiden onkin
 15 todettu olevan parhaita CLA:n lähteitä.

Ravinnosta saatavan CLA:n määrän on todettu laskeneen viimeisen vuosikymmenen aikana huomattavasti. Ravintokoostumusanalyyseissä on laskettu, että 1970-luvulla keskimääräinen dieetti sisälsi noin 0,45 g CLA:ta/päivä. Maidon ja maitotuotteiden käytön laskiessa keskimääräinen saanti
 20 on nykyisin 0,25 g CLA:ta/päivä. Ravinnon sisältämän luontaisen CLA:n kohottaminen on erittäin oleellista kansanterveyden kannalta, sillä CLA:n saannin kaksinkertaistaminen alentaisi tutkimusten mukaan mm. syöpäriskiä.

Elintarvikkeista erityisesti maidon merkitys CLA:n saannin lähteenä on tuotu esille useissa tutkimuksissa. Mm. suomalaisen väestötutkimuksen
 25 (Knekt ym., suullinen tiedonanto) mukaan maidon käyttö alensi rintasyöpäriskiä. Nykyisin maitorasvan CLA-pitoisuus vaihtelee huomattavasti (2,4 - 28,1 mg/g rasvaa) kausittain riippuen ruokinnan laadusta.

Suoliston hyötymikrobien on todettu muodostavan CLA:ta. Erityisesti on tutkittu pötsin *Butyrivibrio fibrisolvens* -bakteeria ja sen isomeraasi-entsyymiä.
 30 Tämä bakteeri on kuitenkin niin anaerobinen, ettei CLA:n tuotto sillä ole mahdollista teollisessa mittakaavassa, koska kannan vaatimien täysin anaerobisten olosuhteiden saavuttaminen on vaikeaa ja epätaloudellista (US 5,856,149, Pariza et al.).

Myös *Propionibacterium agnes* -lajin on todettu tuottavan CLA:ta,
 35 mutta tämä patogeeninen kanta tuottaa myös reduktaasi-entsyymiä, joka

pelkistää tuotetun CLA:n edelleen muiksi rasvahapoiksi (Verhulst et al., System. Appl. Microbiol. 9 (1987)12 - 15).

Yleisesti on myös tunnettua, että eräät propionihappobakteerit pystyvät muuntamaan linolihappoa sen konjugoiduksi cis-9,trans-11 -muodoksi.

5 Yleisesti tiedetään lisäksi, että vapaan linolihapon konversio CLA:ksi on tehokkaampaa kuin triglyseridimuodossa olevan rasvahapon. Vapaalla linolihapolla on kuitenkin propionihappobakteerien kasvua estävä vaikutus jo melko pieninä pitoisuuksina, mikä tähän asti on estänyt konjugoidun linolihapon ja varsinkin sen cis-9,trans-11 -muodon tuottamisen suuressa mittakaavassa.

10 US-patentissa 5,856,149, Pariza ja Yang, kuvataan menetelmää cis-9,trans-11 -rasvahapon tuottamiseksi konjugoimattoman tyydyttymättömän (kaksoissidokset kohdissa 9 ja 12) rasvahapon konversiolla *Lactobacillus reuteri* -kannan, edullisesti *L. reuteri* PYR8 -kannan, avulla. Julkaisussa kuvataan CLA:ta tuottavien kantojen eristystä ja todetaan, että 45 eristetyistä kannasta
15 ainoastaan neljällä oli haluttua linoleaatti-isomeraasi-aktiivisuutta ja ne pystyivät siis tuottamaan CLA:ta linolihaposta. Julkaisussa ei mainita vapaan linolihapon bakteerien kasvua inhiboivaa vaikutusta eikä siten myöskään esitetä ratkaisua tämän ongelman välttämiseen.

J. Jiang, L. Björck ja R. Fonden esittävät artikkelissa Production of
20 conjugated linoleic acid by dairy starter cultures, J. Appl. Microbiol. 85 (1998) s. 95 - 102, propionihappobakteerien kyvyn muuttaa linolihappoa CLA:ksi. Jiang et al. tutkivat 19 eri hapatebakteerin kykyä muuttaa kasvualustaan lisätty linolihappo CLA:ksi havaittuaan kypsytettyjen juustojen sisältävän muita maitotuotteita korkeampia määriä CLA:ta. He tutkivat 7 laktobasilli-kannan, 4
25 laktokokkikannan, 2 streptokokkikannan ja 6 propionihappobakteerin kykyä tuottaa CLA:ta MRS-, maito- ja Na-laktaattialustalla linolihaposta. Lisäksi tutkittiin eri linolihappopitoisuuksia lisäämällä linolihappoa MRS-liemeen Tween 80 -detergentin vesiliuoksessa. Tutkituista bakteereista ainoastaan muutamalla propionihappobakteerilla havaittiin biokonversioaktiivisuutta, kuudesta kannasta
30 kolme, eli *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* PFF ja PFF6 sekä *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* PFS osoittivat aktiivisuutta. PFF6-kannalla saavutettiin maksimituotto 265 µg/ml CLA:ta alkuperäisestä linolihappopitoisuudesta 750 µg/ml. Tuotetusta CLA:sta biologisesti aktiivista c9,t11-isomeeriä oli 70 - 90 %. Yhdenkään laktobasillin, laktokokin tai
35 streptokokin ei todettu tuottavan CLA:ta.

Paras propionihappobakteeri, PFF6-kanta, pystyi siis Jiangin et al. kuvaamalla tekniikalla muuntamaan vain 35 % lisätystä linolihaposta CLA:ksi. Tutkijat havaitsivat propionihappobakteerien CLA:n tuoton korreloivan positiivisesti niiden sietokykyyn vapaan linolihapon suhteen. Tässäkin tutkimuksessa todettiin siis yleisesti tunnettu seikka, että linolihapolla on bakteerien kasvua estävä antimikrobinen vaikutus. Julkaisussa mainitaan, että antimikrobisten rasvahappojen vaikutusta voidaan vähentää käyttämällä pinta-aktiivisia aineita, kuten detergenttiä, esimerkiksi Tween 80, tai proteiinia. Tämän suuntaisia tutkimuksia ei kuitenkaan ole suoritettu eikä julkaisussa esitetä mahdollisia käyttökelpoisia tekniikoita.

WO 99/29886, J. Jiang, L. Björck ja R. Fonden, perustuu osittain edellä mainitussa artikkelissa kuvattuihin tutkimustuloksiin. Hakemus koskee tiettyjen elintarvikesovelluksiin käyttökelpoisten bakteerien käyttöä CLA:n tuottoon in vitro. Sopivina bakteereina mainitaan *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* ja *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* lisäksi myös *Bifidobacterium breve*. Julkaisun mukaan fermentointi voidaan suorittaa emulgaattorin läsnäollessa, esimerkkeinä mainitaan Tween 80 ja lesitiini. Tämänkään julkaisun esimerkeissä ei kuitenkaan kuvata emulgaattorin käyttöä, ja parhaana tuloksena ilmoitetaan sama kuin edellä mainitussa sovelluksessa; biologisesti aktiivista c9,t11 -isomeeriä saatiin 246,4 µg/ml alkuperäisestä linolihappopitoisuudesta 750 µg/ml käyttäen kantaa PFF6. Saantojaukseen siis alle 33 %.

FI-patentissa 88856 kuvataan menetelmää fermentoidun, pääasiallisesti kauraleseeseen perustuvan ja eläviä mikro-organismeja sisältävän elintarvikkeen valmistamiseksi. Kauralese fermentoidaan joko sellaisenaan tai lämpökäsittelyn jälkeen, mikro-organismeina käytetään maitohappobakteereja, erityisesti *Lactobacillus acidophilus*. Julkaisussa kuvatus keksinnön tarkoituksena on hyödyntää kauran korkeaa kuitupitoisuutta uudentyyppisessä elintarviketuotteessa, josta esimerkkinä kuvataan jogurttityyppinen välipalaruoka. Linolihappoa tai siitä muodostettua konjugoitua linolihappoa ei julkaisussa mainita.

Siten on edelleenkin selkeä tarve aikaansaada uusia menetelmiä konjugoidun linolihapon tuottamiseksi. Haluttaessa valmistaa CLA:ta mikrobiologisten menetelmien avulla oleellista on se, miten ulkopuolisen linolihapon toksisuuteen ja antimikrobiseen vaikutukseen liittyvät ongelmat

voidaan minimoida tai välttää. Myös sellaiset menetelmät, joissa voitaisiin hyödyntää uusia raaka-aineita CLA:n tuottamiseen, ovat hyvin tervetulleita.

Keksinnön lyhyt kuvaus

Esillä oleva keksintö perustuu siihen, että linoli happolähteenä
5 hyödynnetään viljaa. Viljoista kauraa pidetään ensisijaisena linoli hapon lähteenä.

Keksintö koskee siten menetelmää konjugoidun linoli hapon, CLA:n, valmistamiseksi linoli haposta, jossa menetelmässä linoli hapon lähteenä käytetään linoli happoa sisältävää viljaa.

10 Keksinnön mukainen menetelmä käsittää edullisesti kaksi vaihetta, joissa viljan rasva hydrolysoidaan linoli hapon vapauttamiseksi siitä ja vapautunut linoli happo isomeroidaan mikrobien avulla konjugoiduksi linoli hapoksi.

Keksintö koskee myös viljan käyttöä konjugoituneen linoli hapon valmistamiseksi.

15 Keksintö koskee edelleen keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettuja tuotteita ja niiden käyttöä sellaisenaan tai terveysvaikutteisten aineiden valmistuksessa.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

20 Keksinnön mukaiselle menetelmälle konjugoidun linoli hapon valmistamiseksi mikro-organismien avulla on tunnusomaista, että linoli happoa sisältävän viljan rasva hydrolysoidaan ja hydrolyysissä vapautunut linoli happo isomeroidaan mikro-organismien avulla konjugoiduksi linoli hapoksi.

Keksintö perustuu siis siihen, että linoli hapon lähteenä käytetään viljaa. Keksinnön mukaisesti viljasta vapautetaan linoli happoa rasvan
25 hydrolyysireaktion avulla. Esillä olevan keksinnön puitteissa on yllättäen todettu, että käytettäessä viljamateriaalia linoli hapon lähteenä esillä olevassa hakemuksessa kuvatulla tavalla, linoli happo ei inhiboi isomerointireaktiota. Käytettäessä viljaa, erityisesti kauraa, lähtömateriaalina voidaan siis varmistua siitä, että linoli happoa on mikrobien käytössä koko isomeroinnin ajan, sen
30 kuitenkin estämättä bakteerien toimintaa.

Lähtöaineena käytettävä vilja voi olla mikä tahansa linoli happoa sisältävä vilja, joka soveltuu nautittavaksi tarkoitetun tuotteen lähtöaineeksi. Esimerkkeinä mainittakoon kaura, ohra, ruis, vehnä tai niistä valmistetut maltaat. Raaka-aineena käyvät muun muassa käsittelemättömät ja käsitellyt viljanjyvät ja
35 niistä valmistetut jakeet.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti edullisin lähtöaine on kaura. Kaura sisältää linolihappoa noin 2 – 4 % kuiva-aineesta, ja linolihappo on suurelta osin sitoutuneena di- ja triglyserideihin. Kaura sisältää myös lipaasi-entsyymiä, joka pilkkoo di- ja triglyseridejä vapaiksi rasvahapoiksi. Kaura on siis
 5 edullinen lähtöaine keksinnön tarkoituksia ajatellen johtuen sekä sen korkeasta linolihappopitoisuudesta että siinä luontaisesti esiintyvistä lipaasi-aktiivisuuksista.

Rasvan hydrolyysireaktiossa voidaan hyödyntää viljan, erityisesti kauran, luonnostaan sisältämää lipaasi-aktiivisuutta. Reaktiossa tarvittava
 10 entsyymiaktiivisuus voidaan myös lisätä ulkoisesti. CLA:n saantoa voidaan sekä kauran että varsinkin muiden viljojen ollessa kyseessä parantaa lisäämällä reaktioon lipaasi-entsyymiä tarpeen mukaan.

Kauran tai muun viljan rasvan entsyymaattista hydrolyysiä voidaan myös helpottaa suorittamalla esikäsitteily. Eräs edullinen esikäsitteilytapa on
 15 mallastaminen, jota käyttämällä viljoihin voidaan tuottaa lipaasiaktiivisuutta. Muina sopivina esikäsitteilyinä voidaan mainita esimerkiksi murskaaminen, jauhaminen, hienontaminen, ja liuottaminen sopivaan liuottimeen, erityisesti veteen tai muuhun nestemäiseen väliaineeseen.

Esimerkiksi kauran lipolyysi voidaan käynnistää murskaamalla
 20 kaurajyvät ja lisäämällä murskattuun kauraan vettä. Lipolyysissä muodostuva vapaa linolihappo sitoutuu osittain kauran muihin komponentteihin, mikä vähentää isomerointireaktioon käytettävissä olevan linolihapon määrää, ja mitä näin tulee pyrkiä välttämään.

Ongelmaa voidaan vähentää ja jopa eliminoida reaktio-olosuhteiden
 25 valinnalla. Olosuhteiden valinnassa on keskeisintä, että estetään kauramateriaalin luontainen pH:n lasku pitämällä pH tarpeeksi korkeana linolihapon isomerointivaiheen aikana. Sopiva pH on esimerkiksi 6,5 - 9. Edullisesti pH säädetään arvoon noin 7,0 - noin 9,0, edullisemmin arvoon noin 8,0 – 8,5. Tämä pH:n säätö estää linolihapon sitoutumista kauramateriaaliin ja se ilmenee edullisena vaikutuksena isomerointireaktiolle. Tärkeätä on, että isomerointiseok-
 30 sessa pH:n lasku aiheutuu kauramateriaalista itsestään eikä fermentaatiosta. Isomerointireaktio ei siten edellytä perinteistä fermentointia, t.s. hapattamista, vaan kyse on biokonversiosta. Isomerointireaktiossa muodostuvasta CLA:sta suurin osa on cis-9,trans-11 –isomeeriä.

Keksinnön mukaisesti (kaurasta) vapautettua linolihappoa käytetään siis CLA:n tuotantoon. Isomerointireaktio voidaan suorittaa esimerkiksi

kemiallisesti, entsymaattisesti, tai mikrobiologisesti. Linolihapon konversio CLA:ksi suoritetaan edullisesti mikrobiologisesti. Biokonversiossa voidaan käyttää mitä tahansa bakteeria, jolla on kyky muuttaa linolihappo CLA:ksi, kuten esimerkiksi edellä tekniikan tason kuvauksessa mainittuja bakteereja. Edullisesti

5 isomerointi suoritetaan kuitenkin elintarvikekäyttöön soveltuvien hyötybakteerien, erityisesti propionihappobakteerien avulla. Sopivina pidetään esimerkiksi lajiin *Propionibacterium freudenreichii* kuuluvia kantoja, ja erityisesti alalajeihin *P. freudenreichii ssp. freudenreichii* ja *P. freudenreichii ssp. shermanii* kuuluvia kantoja.

10 Isomerointi suoritetaan sinänsä tunnetulla tavalla. Isomeroointiseoksen komponentit ja olosuhteet valitaan käytettävän kannan vaatimusten mukaisesti niin, että saadaan optimaalinen CLA:n tuotto. Esillä olevan keksinnön julkaisemisen jälkeen sopivien reaktioparametrien valinta on alan ammattimiehen tietotaitoihin kuuluva asia.

15 Rasvan hydrolyysi- ja isomerointivaiheet voidaan suorittaa rinnakkain eli samanaikaisesti tai peräkkäin, eri astioissa tai samassa astiassa. Vaiheiden suorittamista samanaikaisesti yhdessä astiassa pidetään edullisena vaihtoehtona menetelmän helppouden takia.

Erityisen edullisessa suoritusmuodossa jauhettuun kauraan lisätään

20 hyötybakteereja, edullisesti propionihappobakteereja, jolloin lipolyysissä vapautuvan linolihapon annetaan suoraan reagoida hyötybakteerien kanssa, jotka isomeroivat linolihapon konjugoiduksi linolihapoksi. Säättämällä prosessiolosuhteet sopiviksi lipolyysille ja isomerointireaktiolle saadaan seokseen muodostumaan CLA:ta huomattavia määriä. Sekoittumisen

25 helpottamiseksi väliaineena voidaan käyttää vettä tai muuta sopivaa, erityisesti nestemäistä, väliainetta. Esillä olevan keksinnön puitteissa on esimerkiksi käyttämällä väliaineena vettä siten, että kauraseoksen kuiva-ainepitoisuus on 5 %, saatu CLA:ta muodostumaan noin 1 % kauran kuiva-aineesta ja noin 10 % kauran rasvasta.

30 Yhdistämällä viljan ominaisuudet isomerointikyvyn omaavan bakteerin käyttöön katalyyttinä isomerointireaktiossa vältetään kahdesta suurimmasta CLA:n valmistukseen liittyvästä ongelmasta; linolihapon toksisuudesta ja sen vaikealiukoisuudesta veteen. Edullisesti CLA:ta tuottavan kannan kyky yhdistetään linolihappoa ja lipaasia sisältävään materiaaliin, joka

35 murskattuna tarjoaa CLA:n tuottamiseen tarvittavaa linolihappoa ilman mitään muita lisäyksiä. Tällainen materiaali viljojen joukossa on kaura. Käytettäessä

materiaaleja, jotka eivät sisällä lipaasiaktiivisuutta, kuten esimerkiksi vehnää, ulkoista lipaasiaktiivisuutta voidaan lisätä tai muodostaa mallastamalla. Esillä olevan keksinnön mukaisesti välttää myös ulkopuolisen linolihapon "liuottamiseen" tarvittavien detergenttien tai muiden haitallisten apuaineiden käytöltä.

Keksinnön mukaisesti muodostettua CLA:ta sisältävää (kaura)-bakteeriseosta voidaan käyttää sellaisenaan, sitä voidaan lisätä tai käyttää elintarvikkeiden ja vastaavien muiden terveysvaikutteisten tuotteiden valmistuksessa, ja siitä voidaan eristää erilaisia CLA:ta sisältäviä fraktioita. CLA:n muodostus voi tapahtua samanaikaisesti elintarvikkeen valmistuksen yhteydessä. Muodostettaessa erilaisia tuotteita niissä voidaan aina kulloinkin halutulla tavalla hyödyntää CLA:n, hyötybakteerien ja/tai viljan kuten esimerkiksi kauran tunnettuja terveydellisiä ominaisuuksia.

Edullisina sovellusmuotoina pidetään niitä, joissa konjugoitu linolihappo eristetään isomeroitiseoksesta. Kun halutaan hyödyntää sekä konjugoidun linolihapon että bakteerisolujen terveydellisiä vaikutuksia, voidaan ne yhdessä ottaa talteen, konsentroida ja mahdollisesti (kylmä)kuivata. Käytettäessä vettä väliaineena CLA saadaan sidotuksi (kaura)-bakteerikiintoaineeseen pH:n laskun avulla. Keksinnön mukaisesti konjugoitu linolihappo voidaan kiinnittää kiintoaineeseen säätämällä reaktioseoksen pH arvoon noin 3 – noin 9, edullisesti arvoon alle 7,0, edullisimmin arvoon noin 4 – 6.

Käsitteellä elintarvike on tässä julkaisussa laaja merkitys kattaen kaikki nautittavaksi tarkoitetut tuotteet, jotka voivat olla kiinteässä, hyytelöidyssä tai nestemäisessä muodossa, ja kattaen sekä valmiit tuotteet että tuotteet, joihin keksinnön mukainen tuote lisätään nauttimisen yhteydessä, lisäaineeksi tai osaksi tuotetta. Elintarvikkeet voivat olla esimerkiksi meijeriteollisuuden, lihanjalostusteollisuuden, einesteollisuuden, juomateollisuuden, leipomoteollisuuden, makeisteollisuuden ja rehuteollisuuden tuotteita. Tyypillisiä ovat maito- ja maitotuotteet, kuten jogurtti, villi, rahka, piimä, kimupiimä, muut hapanmaitojuomat, tuorejuustot ja kypsytetyt juustot, välipalasnackien täytteet, jne., juomat, kuten herajuomat, hedelmäjuomat, oluet ja keitot. Toisen tärkeän ryhmän muodostavat rehuteollisuuden tuotteet.

Edullisina käyttösovelluksina esitetään lyofilisoidut valmisteet, kuten CLA:ta ja kauraa sisältävät propionihappobakteerikapselit ja jauheet, sekä tuotteet, joiden CLA-pitoisuus on nostettu propionihappobakteerin toiminnan avulla. Erityisen edullisia ovat tuotteet, jotka sisältävät sekä CLA:ta että kauran

komponentteja, kuten esimerkiksi β -glukaania, ja joissa siis molempien ainesosien terveydelliset vaikutukset tulevat esille. Esillä olevan keksinnön merkittävänä lisähyötynä saadaan kauravalmisteisiin konjugoitua linolihappoa ja siten kauran elintarvikearvoa kohotetuksi.

- 5 Keksintöä kuvataan yksityiskohtaisemmin seuraavien esimerkkien avulla. Nämä esimerkit annetaan vain keksinnön valaisemiseksi eikä niitä pidä katsoa sen suojapiiriä mitenkään rajoittaviksi.

Viite-esimerkki 1.

Fermentoidun kauraleseeseen perustuvan tuotteen CLA-

10 pitoisuus

- FI-patentissa 88856 kuvattujen hapattamalla valmistettujen tuotteiden rasvahappokoostumus sekä öljyhappo-, linolihappo- ja CLA-pitoisuus määritettiin seuraavalla tavalla. Kaupallisista tuotteista, Yosa metsämarja ja Yosa luumu, valmistaja Bioferme Oy, Suomi, otettiin näytteet ja niistä eristettiin
- 15 rasva suorasaippuoinnilla ja dietyylieetteri-heksaani -uutolla. Rasvahappojen metyyliesterit valmistettiin rikkihappokatalysoidulla menetelmällä. Taulukossa A on esitetty näytteiden rasvahappokoostumukset prosentteina (%) kokonaisrasvahapoista ja taulukossa B öljyhappo-, linolihappo- ja CLA (c9,t-11)-pitoisuudet on esitetty mg/g näytettä. Yosa luumu - ja Yosa metsämarja
- 20 -tuotteet eivät sisältäneet CLA:ta lähes ollenkaan. Hyvin pienet CLA-jäämät saattavat olla syntyneet analyysimenetelmien vaikutuksesta tai ne voivat olla linoleenihapon (C_{18:3}) isomeereja, jotka eluoituvat kaasukromatografisessa analyysissä lähellä CLA:ta.

25 Taulukko A. Yosa-näytteiden rasvahappokoostumukset, prosentteina (%) kokonaisrasvahapoista

Yosa	Palmitiini- happo C _{16:0}	Steariini- happo C _{18:0}	Öljyhappo C _{cis-9-18:1}	Linoli- happo C _{18:2}	Linoleenih. C _{18:3}	CLA (c-9,t-11) C _{18:2}
Luumu	16,07	1,21	32,05	39,63	2,04	0,05
Metsämarja	15,58	1,14	30,93	39,45	3,68	0,07

Taulukko B. Yosa-näytteiden öljyhappo-, linolihappo- ja CLA-pitoisuudet, mg/g näytettä

Yosa	Öljyhappo mg/g näytettä	Linolihappo mg/g näytettä	CLA (c-9,t-1 1) mg/g näytettä
Luumu	1,77	2,15	0,003
Metsämarja	1,65	2,08	0,004

5 **Esimerkki 1.**

CLA:n tuotto kauravesiseoksessa propionihappobakteerien avulla

Keksinnön mukaisen menetelmän tehon osoittamiseksi tehtiin koe, jossa kauravesiseokseen lisättiin propionihappobakteerisoluja isomeroitinkatalyytiksi. Kokeessa käytettiin kaurajauhoa, joka oli valmistettu lämpökäsittelmättömästä kaurasta (Lisbeth-lajike) jauhamalla 0,5 mm seulan läpi. Kaurajauhosta valmistettiin 5 % (w/v) vesiseos ja seosta homogenoitiin Ultra Turrax -laitteistolla noin kahden minuutin ajan.

Kokeessa käytettiin kahta propionihappobakteerikantaa, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS (PJS) ja *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* 131 (P131).

PJS-solujen kasvatus koetta varten tehtiin kuten on esitetty julkaisussa Rainio, A., Vahvaselkä, M., Suomalainen, T. ja Laakso, S., Reduction of linoleic acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, Can. J. Microbiol. 47 (2001) 735-740. Kanta P131 kasvatettiin MRS-liemessä (LabM). Solut sentrifugoitiin (6000 rpm, 20 min) erilleen ja lietettiin pieneen määrään peptonisuolaliuosta, joka sisälsi 0,1 % bakteriologista peptonia (LabM), ja 0,85 % NaCl. Solususpensio lisättiin kauravesiseokseen (a' 100 ml) siten, että solupitoisuudeksi tuli noin 1×10^{10} prmy/ml. Seoksen pH säädettiin arvoon 7,0 1 M NaOH-liuoksella ja hydrolyysi- ja isomeroitireaktion annettiin tapahtua 25 °C:ssa. Ensimmäisten noin 17 tunnin aikana kauravesiseoksen annettiin hydrolysoitua ilman pH:n säätöä, jolloin pH laski noin arvoon 4,8. Tämän jälkeen seoksen pH nostettiin arvoon 8,0 NaOH-liuoksella ja säätö toistettiin noin 1,5 - 2 tunnin välein noin kahdeksan tunnin ajan. Seoksen pH-arvo pysyi siten noin välillä 7,5 - 8,0. Tämän jälkeen isomeroitintia jatkettiin ilman pH:n säätöä kunnes kokonaisajaksi muodostui noin 40 tuntia.

Vertailuna tehtiin koe, jossa kauravesiseokseen lisättiin PJS- tai P131-solususpension sijasta vastaava tilavuus peptonisuolaliuosta. Ensimmäisen 17 tunnin aikana seoksen pH laski noin arvoon 5,4. Tämän jälkeen pH:tä säädettiin kuten edellä kuvatussa kokeessa.

5 Kokeessa seurattiin linolihapon vapautumista kauran luontaisen lipaasientsyymin toiminnan vaikutuksesta ja tämän vapaan linolihapon isomeroitumista CLA:ksi mikrobisolujen avulla. Kauravesiseoksesta otettiin 0,5 ml:n näytteitä, jotka kylmäkuivattiin ennen rasvahappoanalyysiä. Näytteistä
10 määritettiin eri rasvahappojen määrät kaasukromatografisesti. Rasvahappojen analysointi suoritettiin kuten on esitetty julkaisussa Suutari M., Liukkonen, K. ja Laakso, S., Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids, J. Gen. Microbiol. 136 (1990) 1469-1474. Näytteissä olevat rasvahapot tunnistettiin
15 vertaamalla niiden retentioaikoja tunnettujen rasvahappostandardien retentioaikoihin. Konjugoidun linolihapon tunnistamiseen käytettiin Sigman valmistetta, joka oli seos CLA:n cis- ja trans-9,11- sekä cis- ja trans-10,12-isomeereista. Rasvahappojen kvantitointiin käytettiin sisäisenä standardina C17:0-rasvahapon metyyliesteriä (heptadecanoic acid methyl ester, Sigma).

Rasvahappojen lipidiluokka-analyysiä varten otettiin kauravesiseoksesta 1,5 ml:n näytteitä, jotka kylmäkuivattiin. Lipidiluokka-analyysi tehtiin kuten
20 on esitetty julkaisussa Liukkonen, K.H., Montfoort, A. ja Laakso, S., Water-induced lipid changes in oat processing, J. Agric. Food Chem. 40 (1992) 126 - 130.

Linolihapon ja muodostuneen CLA:n määrät laskettiin reaktioajan funktiona näytekuiva-ainetta kohden. Koe tehtiin kauravesiseoksessa sekä
25 propionihappobakteerien (PHB) kanssa että ilman niitä. Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Linolihapon ja muodostuneen CLA:n määrät reaktioajan funktiona laskettuna näytekuiva-ainetta kohden.

Aika (h)	linolihappo (mg/g ka.)			CLA (mg/g ka.)		
	PJS-solut	P131-solut	ei PHB-soluja	PJS-solut	P131-solut	ei PHB-soluja
0	41,9	36,3	43,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1
17	40,7	-	-	0,6	-	-
21,5	36,3	-	-	4,8	-	-
25	33,6	-	-	6,5	-	-
41	32,3	32,7	42,3	7,6	0,7	< 0,1

5

CLA:n muodostus vaati siten propionihappobakteerin toimintaa isomeroitnikatalyyttinä kauravesiseoksessa. PJS-kantaa käytettäessä CLA:ta muodostui huomattavia määriä, 7,6 mg/g k.a. Tämä määrä oli 7,3 % kauran rasvasta.

10

Taulukossa 2 on esitetty linolihapon ja CLA:n jakautuminen eri lipidiluokkiin kauravesiseosta inkuboitessa PJS-solujen kanssa. PL = polaariset lipidit, TG = triglyseridit, DG = diglyseridit ja FFA = vapaat rasvahapot.

Taulukko 2. Linolihapon ja CLA:n jakautuminen eri lipidiluokkiin (%)

15 kokeen aikana.

Aika	Yhdiste	PL	TG	DG	FFA
0 h	linolihappo	12	81	3	4
17 h	linolihappo	9	49	5	37
41 h	linolihappo	12	40	5	43
41 h	CLA	4	8	1	87

Tuloksista nähdään, että kokeen alussa suurin osa linolihaposta oli sitoutuneena triglyserideihin ja vain 4 % vapaana rasvahappona. Sen sijaan 17 tunnin hydrolyysin jälkeen linolihaposta oli lähes 40 % vapautunut triglyserideistä. Muodostuva CLA oli suurimmaksi osaksi (lähes 90 %) vapaana rasvahappona. Muodostuneesta CLA:sta vähintään 80 % oli cis-9,trans-11 - isomeeria.

Elävien propionihappobakteerisolujen pitoisuudet määritettiin käyttämällä puskuroitua natriumlaktaattiagaria, joka sisälsi 0,5 % tryptonia (LabM), 1 % hiivauutetta (LabM), 16,8 ml/l 50 % Na-laktaattia (Merck), 1 % β -glyserofosfaatin dinatriumsuolaa (Merck) ja 1,5 % agarua (LabM). Maljoja inkuboitiin anaerobisesti 30°C:ssa 6 vrk. Kokeen alussa PJS-pitoisuus oli $9,0 \times 10^9$ pmy/ml ja 20 tunnin jälkeen $7,5 \times 10^9$ pmy/ml. Tulosten perusteella propionihappobakteerisolut eivät siis kasvaneet kauravesiseoksessa reaktion aikana.

Kauravesiseoksen pH pyrki laskemaan nopeasti riippumatta siitä, oliko seokseen lisätty propionihappobakteeria vai ei. pH:n lasku aiheutuu kauran sisältämien happamien aineosien liukenemisesta veteen. Menetelmä ei siis edellytä, että solut pystyvät fermentoimaan kauraa, jolloin muodostuvat orgaaniset hapot laskisivat pH-arvoa.

Esimerkki 2

CLA:n tuotto muista viljoista propionihappobakteerien avulla

Esimerkki 1 toistettiin käyttämällä kauran sijasta ohraa ja ruista. Propionihappobakteerina käytettiin *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS (PJS) -soluja. Tulosten perusteella CLA:n tuotto ohra- ja ruisvesiseoksissa oli selvästi heikompaa kuin kauravesiseoksessa, ohraassa muodostui 0,91 ja rukiissa 0,83 mg CLA / g kuivaa ainetta 41 tunnin inkuboinnin aikana, joissa pH säädettiin arvoon 8,0 aikavälillä 17 - 25 tuntia. Heikommat tulokset selittyvät osittain sillä, että näiden viljojen linolihappopitoisuus on pienempi kuin kauran, ja lisäksi ne eivät tunnetusti sisällä lipaasiaktiivisuutta ilman idätystä. Tulosten perusteella on kuitenkin selvää, että keksinnön mukainen menetelmä toimii myös muissa viljamateriaaleissa. Vapaan linolihapon muodostumista voidaan myös tehostaa lisäämällä reaktioseokseen ulkoista lipaasiaktiivisuutta, jolloin menetelmän saantoa voidaan parantaa huomattavasti edellä annetuista arvoista.

Esimerkki 3.

pH:n vaikutus CLA:n muodostukseen

Kauravesiseoksen pH:n vaikutusta CLA:n muodostumiseen selvitetiin seuraavilla kokeilla:

- pH:ta ei säädetty ollenkaan
- pH säädettiin arvoon 8,0 aikavälillä 0 - 8 tuntia (kokeessa ei siis erillistä rasvan hydrolyysivaihetta)
- pH säädettiin arvoon 7,0 aikavälillä 17 - 25 tuntia
- pH säädettiin arvoon 8,0 aikavälillä 17 - 25 tuntia

- pH säädettiin arvoon 8,5 aikavälillä 17 - 25 tuntia

- pH säädettiin arvoon 9,0 aikavälillä 17 - 25 tuntia

Kaikissa yllämainituissa kokeissa PJS-bakteerikanta lisättiin kauravesiseokseen kuten esimerkissä 1 on kuvattu. Myös muut koejärjestelyt olivat samoja.

Tämän lisäksi tehtiin koe fermenttorissa, jossa kauravesiseoksen pH pidettiin koko isomerointivaiheen ajan (17 - 41 h) arvossa 8,5 NaOH-liuoksen automaattisen lisäyksen avulla. Sitä edeltävässä 17 tunnin lipolyysivaiheessa pH laski arvoon 4,7. Kauravesiseoksen tilavuus oli 1,5 litraa, lämpötila 25 °C ja sekoitusnopeus 100 rpm. Elävien PJS-solujen pitoisuus alussa oli $1,1 \times 10^{10}$ pmy/ml ja kokeen lopussa $8,4 \times 10^9$ pmy/ml.

Tulokset on esitetty taulukossa 3. Tulosten perusteella CLA:n muodostus oli tehokasta, kun kauravesiseoksen pH säädettiin välille 8,0 - 8,5 sen jälkeen, kun lipaasientsyymi oli ehtinyt vapauttaa linolihappoa. Tämä tapahtui parhaiten alemmassa pH:ssa kuin isomerointireaktio. Nopein ja suurin CLA:n muodostus saavutettiin, kun kauravesiseoksen pH pidettiin jatkuvalla säädöllä koko isomerointivaiheen ajan arvossa 8,5. Tämä kuvastaa isomerointireaktiolle optimaalisen pH-tason merkitystä prosessissa.

20 Taulukko 3. Kauravesiseoksen pH:n vaikutus CLA:n muodostukseen.

	CLA (mg/g ka.)	
	25 h	41 h
pH:ta ei säädetty		0,9
pH säädettiin noin arvoon 8,0 välillä 0 - 8 h	3,5	
pH säädettiin noin arvoon 7,0 välillä 17 - 25 h		3,9
pH säädettiin noin arvoon 8,0 välillä 17 - 25 h	6,5	7,6
pH säädettiin noin arvoon 8,5 välillä 17 - 25 h		7,9
pH säädettiin noin arvoon 9,0 välillä 17 - 25 h		6,0
pH pidettiin arvossa 8,5 automaattisäädöllä välillä 17-41 h	8,2	9,3

Esimerkki 4.

Tuotetun CLA:n konsentroidi kaurakuiva-aineeseen pH:n laskun avulla

- CLA:n tuotto kauravesiseoksessa suoritettiin esimerkin 1 mukaisesti
- 5 PJS-solujen avulla. Tämän jälkeen kauravesiseoksen pH säädettiin NaOH-liuoksella arvoon 8,0 tai HCl-liuoksella arvoon 4,5. Seokset sentrifugoitiin ja CLA-pitoisuudet määritettiin supernatanteista ja kaurabakteerimassoista. CLA jakautui seuraavasti: pH:ssa 8,0 CLA:sta 85 % oli kiintoaineessa ja 15 % nestefaasissa, pH:ssa 4,5 100 % CLA:sta oli kiintoaineessa. Tulos tarjoaa
- 10 menetelmän, jolla pH:n laskemisen avulla CLA saadaan konsentroitumaan kauran ja bakteerisolujen muodostamaan kiintoaineeseen eikä se siten poistu väliaineen mukana.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä konjugoidun linolihapon valmistamiseksi mikro-
organismien avulla, t u n n e t t u siitä, että linolihappoa sisältävän viljan rasva
5 hydrolysoidaan, ja hydrolyysissä vapautunut linolihappo isomeroidaan mikro-
organismin avulla konjugoiduksi linolihapoksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,
että vilja on kaura, ruis, ohra tai vehnä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,
10 että vilja on kaura tai kauran jae.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että rasvan hydrolyysin aikaansaa viljan oma entsyymiaktiivi-
suus.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n -
15 n e t t u siitä, että rasvan hydrolyysi suoritetaan ulkoista entsyymiaktiivisuutta
lisäten.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että isomerointi suoritetaan hyötybakteer(e)illa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,
20 että hyötybakteeri on propionihappobakteeri.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,
että propionihappobakteeri on lajiin *Propionibacterium freudenreichii*, ja edulli-
sesti sen alalajiin *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* tai *Pro-*
pionibacterium freudenreichii ssp. *shermanii*, kuuluva kanta.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,
25 että propionihappobakteeri on *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*
JS, DSM 7067.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 9 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että isomerointi suoritetaan pH-arvossa noin 6,5 - noin 9,5.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
30 siitä, että isomerointi suoritetaan edullisesti pH-arvossa noin 7,0 - noin 9,0,
edullisemmin pH-arvossa noin 8,0 - 8,5.

12. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 11 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, hydrolyysi- ja isomerointivaiheet suoritetaan peräkkäin.

13. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 11 mukainen menetelmä, t u n -
35 n e t t u siitä, että hydrolyysi- ja isomerointivaiheet suoritetaan rinnakkain.

14. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 13 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että konjugoidun linolihapon valmistus tapahtuu elintarvikkeen
valmistuksen yhteydessä.

5 n e t t u siitä, että siinä muodostuu pääasiassa konjugoidun linolihapon cis-9,
trans-11 -isomeeriä.

16. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 15 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että konjugoitu linolihappo kiinnitetään kiintoaineeseen säätä-
mällä reaktioseoksen pH arvoon noin 3 – noin 9, edullisesti arvoon alle 7,0,
10 edullisimmin arvoon noin 4 – 6.

17. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 16 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että konjugoitu linolihappo eristetään reaktioliemestä ja mahdol-
lisesti kuivataan.

18. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 16 mukainen menetelmä, t u n -
15 n e t t u siitä, että konjugoitu linolihappo, bakteerisolut ja lähtöaineena käytetty
vilja, joka edullisesti on kaura-aines, konsentroidaan ja mahdollisesti kuiva-
taan.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että linolihappo, bakteerisolut ja lähtöaineena käytetty vilja, joka edulli-
20 sesti on kaura-aines, otetaan talteen, konsentroidaan ja lyofilisoidaan.

20. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 19 mukaisella menetelmällä saa-
tu tuote.

21. Vilja käytettäväksi konjugoidun linolihapon valmistukseen.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen vilja, t u n n e t t u siitä, että
25 se on kaura.

23. Menetelmä konjugoidun linolihapon valmistamiseksi linolihaposta,
t u n n e t t u siitä, että linolihapon lähteenä käytetään viljaa.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että vilja on kaura.

5

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee menetelmää konjugoidun linolihapon valmistamiseksi. Erityisesti kuvataan menetelmää konjugoidun linolihapon ja varsinkin sen cis-9,trans-11 - isomeerin valmistamiseksi viljasta hyötybakteerien avulla. Keksintö koskee myös menetelmällä valmistettuja tuotteita.

6

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av konjugerad linolsyra. I synnerhet beskrivs ett förfarande för framställning av konjugerad linolsyra och särskilt dess cis-9,trans-11-isomer från säd med hjälp av nyttobakterier. Uppfinningen avser även produkter framställda medelst förfarandet.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.